



(19) RU (11) 2 146 372 (13) C1  
(51) Int. Cl. 7 G 01 N 33/569

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 98107396/14, 16.04.1998

(24) Effective date for property rights: 16.04.1998

(46) Date of publication: 10.03.2000

(98) Mail address:

125167, Moskva, Novozykovskij pr-d 4A,  
Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN,  
patentnyj otdel

(71) Applicant:  
Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN

(72) Inventor: Fevraleva I.S.,  
Sudarikov A.B.

(73) Proprietor:  
Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN

(54) METHOD OF ASSAY OF PARVOVIRUS B 19

(57) Abstract:

FIELD: medicine, virology. SUBSTANCE: invention relates to effective and highly specific methods of assay of parvovirus B 19 in serum blood. Method is based on the use two-stage polymerase chain reaction involving preliminary heat treatment of analyzed sera at 95 C for 10 min. Method involves the use of sera not treated with enzyme proteinase K. At the first stage of reaction method involves the use pair at temperature annealing 44 C and consisting of the nucleotide sequences 5'-GACCTCCAAACCA-3' and 5'-AATTGCTGATACACAG-3' and at the second stage - pair at temperature annealing 56 C

consisting of the nucleotide sequences 5'-CAATTGTCACAGACACCA-3' and 5'-TGAATCCAGACAGGTAAG-3'. Two stages of reaction are carried out in a single tube. EFFECT: accelerated testing, decreased contamination of samples, decreased cost of analysis. 2 dwg

Приложение к заявлению о выдаче патента - 1



Электрофорограмма образцов сывороток больных и здоровых людей, анализ ДНК в которых был проведен предлагаемым методом.

№ 1	-	затравочный линер
№ №2 - 10	-	больные с различными гематологическими заболеваниями.
№ 11	-	контроль за HbO
№ 12	-	контрольная ДНК ПВ B19
№ 13	-	маркер линия амплификации (маркер полоса - 300 оснований)

Фиг. 1

R U 2 1 4 6 3 7 2 C 1

R U ? 1 4 6 3 7 2 C 1



(19) RU (11) 2 146 372 (13) С1  
(51) МПК<sup>7</sup> G 01 N 33/569

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98107396/14, 16.04.1998

(24) Дата начала действия патента: 16.04.1998

(46) Дата публикации: 10.03.2000

(56) Ссылки: MUSIANI M. et al., Persistent B19 Parvovirus Infection in Haemophilic HIV-1 Infected Patients, J.of Med.Virol. 1995, 46, p.103-108. RU 2049476 С1, 10.12.95. RU 2051688 С1, 10.01.96. WO 91/12269 A1, 22.08.91. WO 88/02026 A1, 24.03.88.

(98) Адрес для переписки:  
125167, Москва, Новозыковский пр-д 4А,  
Гематологический научный центр РАМН,  
патентный отдел

(71) Заявитель:  
Гематологический научный центр РАМН

(72) Изобретатель: Февралева И.С.,  
Судариков А.Б.

(73) Патентообладатель:  
Гематологический научный центр РАМН

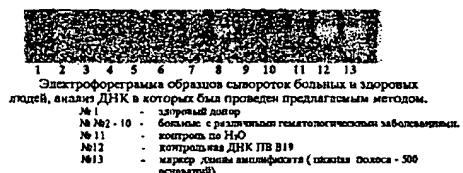
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРВОВИРУСА Б19

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности вирусологии, и касается эффективных и высокоспецифичных способов определения парвовируса B19 в сыворотке крови. Способ основан на постановке двухэтапной полимеразной цепной реакции, включающей предварительную тепловую обработку исследуемых сывороток при 95°C в течение 10 мин. При этом в качестве исследуемых используют сыворотки, не обработанные ферментом proteinase K. В качестве праймеров на первом этапе реакции используют пару с температурой отжига 44 °C, состоящую из 5'-GACCTCCAAACCA-3' и 5'-AATTGCTGATACACAG-3', а на втором этапе - пару с температурой отжига 56°C,

состоящую из  
5'-CAATTGTCACAGACACCAAG-3' и  
5'-TGCATCCAGACAGGTAAG-3'. Два этапа реакции проводят в одной пробирке. Способ позволяет ускорить, удешевить постановку теста, снизить возможность контаминации образцов. 2 ил.

Принцип использования диагностики - 1



Фиг. 1

R U 2 1 4 6 3 7 2 C 1

R U ? 1 4 6 3 7 2 C 1

R U 2 1 4 6 3 7 2 C 1

Изобретение относится к области медицины, а именно к созданию медицинских диагностикумов для определения наличия патогенных вирусов в крови человека. Нами разработан диагностикум для выделения паровируса B19 в сыворотке крови на основе двухэтапной полимеразной цепной реакции.

На сегодняшний день существуют 2 основных метода идентификации ДНК паровируса B19. Первый из них - ДНК-гибридизация [1, 2, 3]. Однако этот метод требует много времени и достаточно трудоемок для скрининга большого числа образцов. Второй метод - двухэтапная полимеразная цепная реакция (nested-PCR). Самая удачная на наш взгляд модификация определения ДНК ПВ B19 описана авторами Musiani M., Gallinella G. et al. [4].

Методика, предложенная Musiani M., Gallinella G. et al.

1. К 50-ти мкл анализируемой сыворотки добавляют 100 мкл лизирующего раствора, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мг/мл желатина, 0,45% NP-40; 0,45% Tween 20 и 0,06 мг Proteinase K. Смесь инкубируют при 56°C в течение одного часа, после чего прогревают в течение 10 мин при температуре 95°C для инактивации фермента и центрифугируют при 14000 об/мин 15 минут. Супернатант используют в PCR.

2. Готовят рабочую смесь для двухэтапной постановки полимеразной цепной реакции (цифры приведены в расчете на одну пробу):

1 этап

а) Реакционный буфер (Tris-HCl (pH 8,3) - 100 мМ, MgCl<sub>2</sub> - 15 мМ, KCl - 500 мМ, желатин 0,1%), мкл - 2,5

б) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-CTTTAGGTATGCCAACTGG-3', 20 мкМ), мкл - 2

в) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-ACACTGAGTTACTAGTGGC-3', 20 мкМ), мкл - 2

г) Смесь ATP, CTP, GTP, TTP (концентрация каждого компонента 2 мМ), мкл - 2,5

д) ДНК-полимераза, ед. активности - 1

е) Супернатант депротеинизированной и прогретой сыворотки, мкл - 5

ж) Деионизованная вода, мкл - До 25

1 этап реакции амплификации проводят в программируемом термостате при следующем температурном режиме: 94°C - 30 сек; 55°C - 1 мин; 72°C - 1 мин, число последовательных циклов - 35.

II этап

а) Реакционный буфер (Tris-HCl (pH 8,3) - 100 мМ, MgCl<sub>2</sub> - 15 мМ, KCl - 500 мМ, желатин 0,1%), мкл - 2,5

б) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-CTTTAGGTATGCCAACTGG-3', 20 мкМ), мкл - 2

в) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-ACACTGAGTTACTAGTGGC-3', 20 мкМ), мкл - 2

г) Смесь ATP, CTP, GTP, TTP (концентрация каждого компонента 2 мМ), мкл - 2,5

д) ДНК-полимераза, ед. активности - 1

е) Амплификат, полученный в результате проведения I этапа, мкл - 5

ж) Деионизованная вода, мкл - До 25

II этап реакции амплификации проводят в программируемом термостате при следующем температурном режиме: 94°C - 30 сек; 55°C - 1 мин; 72°C - 1 мин, число последовательных циклов - 35.

Преимущество предлагаемого нами изобретения в том, что ДНК ПВ B19 определяется непосредственно в сыворотке крови человека без предшествующей обработки ферментом proteinase K и последующей его инактивацией. Это ускоряет и удешевляет постановку теста, не уменьшая его чувствительности. Кроме того, разработанные нами две пары праймеров таковы, что за счет существенной разницы в температуре отжига внешней и внутренней пары исключено участие внешних праймеров на второй стадии реакции, что дает возможность проведения двух этапов в одной реакционной пробирке, а это, в свою очередь, также снижает вероятность контаминации образцов.

Описание предлагаемого способа определения паровируса B19.

1. К 50 мкл сыворотки крови больного добавляют 100 мкл физиологического раствора, содержащего 0,5% детергента NP-40, и смесь прогревают при температуре 95°C в течение 10 минут, после чего центрифугируют при 14000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант используют в PCR.

2. Готовят рабочую смесь для двухэтапной постановки полимеразной цепной реакции (цифры приведены в расчете на одну пробу):

1 этап

а) Реакционный буфер (ТРИС-HCl (pH 8,3) - 100 мМ, MgCl<sub>2</sub> - 25 мМ, KCl - 500 мМ, формамид - 40%), мкл - 2,5

б) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-GACCTCCAAACCAC-3', 20 мкМ), мкл - 2

в) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-AATTGCTGATACACAG-3', 20 мкМ), мкл - 2

г) Смесь ATP, CTP, GTP, TTP (концентрация каждого компонента 2 мМ), мкл - 2,5

д) ДНК-полимераза, ед. активности - 1

е) Супернатант прогретой разведенной сыворотки, мкл - 5

ж) Деионизованная вода, мкл - До 25

1 этап реакции амплификации проводят в программируемом термостате при следующем температурном режиме: 94°C - 1 мин; 44°C - 1 мин; 72°C - 1 мин, число последовательных циклов - 20.

II этап

а) Реакционный буфер (ТРИС-HCl (pH 8,3) - 100 мМ, MgCl<sub>2</sub> - 25 мМ, KCl - 500 мМ, формамид - 40%), мкл - 2,5

б) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-CAATTGTCACAGACACCAG-3', 20 мкМ), мкл - 2

в) Праймер (нуклеотидная последовательность 5'-TGCAATCCAGACAGGTAAG-3', 20 мкМ), мкл - 2

г) Смесь ATP, CTP, GTP, TTP (концентрация каждого компонента 2 мМ), мкл

R U 2 1 4 6 3 7 2 C 1

RU 2 1 4 6 3 7 2 C 1

- 2,5  
д) ДНК-полимераза, ед. активности - 1  
е) Амплификат, полученный в результате проведения I этапа, мкл - 5  
ж) Деионизованная вода, мкл - До 25  
II этап реакции амплификации проводят в программируемом термостате при следующем температурном режиме: 94°C - 1 мин; 56°C - 1 мин; 72°C - 1 мин, число последовательных циклов - 35.

После проведения двухэтапной полимеразной цепной реакции продукт подвергают электрофорезу в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. О наличии ДНК ПВ 19 в исследуемом образце судят по появлению полосы флюoresценции в УФ-свете на соответствующей дорожке в геле. Размер амплификата - 490 оснований.

Таким образом, предлагаемая нами методика отличается от прототипа следующим.

Во-первых, в предлагаемой методике длительный процесс депротеинизации образца сыворотки ферментом протеиназой K и его последующей инактивации заменен 10-минутным прогреванием образца при 95 °C, что позволяет сократить трудоемкость, время выполнения, стоимость анализа, а также исключить возможность контаминации образца на стадии подготовки ПЦР, а следовательно, и возможность получения ложноположительной реакции.

Во-вторых, две пары праймеров подобраны так, что температура отжига для внешней пары праймеров (44°C) существенно ниже, чем для внутренней пары (56 °C). Такая разница в температуре отжига позволяет исключить участие пары внешних праймеров на второй стадии реакции и получить амплификат без примеси неспецифических продуктов реакции. Кроме того, это дает возможность проведения двух этапов в одной реакционной пробирке, что, в свою очередь, также уменьшает вероятность контаминации образцов.

Примеры использования способа приведены на фиг. 1 и 2.

#### Список литературы

1. Shade R.O., Blundell M.C., Cotmore S.F., Tattersall P., Astell C.R. "Nucleotide Sequence and Genom Organization of Human Parvovirus B19 Isoleted from Serum of Child During Aplastic Crisis". J. Virol. 58: 921-936 (1986).  
2. McOmish F., Yap P.L., Jordan A., Hart H., Cohen B.J. and Simmonds P. "Detection of Parvovirus B19 in Donnated Blood: a Model System for Screening by Polymerase Chain Reaction". J. Clin. Microbiol. 31: 323-328 (1993).  
3. Patent: WO 9112269-A 10 22-AUG-1991.  
4. Musiani M., Gallinella G. et al. "Persistent B19 Parvovirus Infection in Haemophilic HIV-1 Infected Patients", J. of Med. Virol., 46: 103-108, 1995.  
5. Frickhofen N., Young N.S. "A Rapid Method of Sample Preparation for Detection of DNA Viruses in Human Serum by PCR", J. Virol. Meth., 35: 65-72 (1991).

#### Формула изобретения:

Способ определения паровируса Б 19 при помощи двухэтапной полимеразной цепной реакции, включающий тепловую обработку образцов исследуемых сывороток при 95°C в течение 10 мин и непосредственно двухэтапную полимеразную цепную реакцию, отличающийся тем, что ДНК ПВ 19 определяется непосредственно в сыворотке крови человека, не обработанной ферментом proteinase K, с последующей его инактивацией и в качестве праймеров на первом этапе реакции используют пару с температурой отжига 44°C, состоящую из 5'-GACCTCCAAACCAC-3' и 5'-AATTGCTGATACACAG-3', а на втором этапе - пару с температурой отжига 56°C, состоящую из 5'-CAATTGTCACAGACACCAG-3' и 5'-TGCAATCCAGACAGGTAAG-3', при этом два этапа реакции проводят в одной пробирке.

40

45

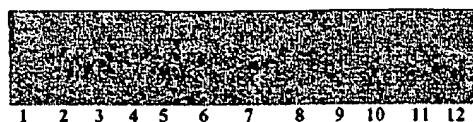
50

55

60

RU 2 1 4 6 3 7 2 C 1

Пример использования диагностикума - 2



Электрофорограмма образцов сывороток больных и здоровых людей, анализ ДНК в которых был проведен предлагаемым методом.

№1 - маркер длины амплификата (нижняя полоса - 520 оснований)  
№ 2 - здоровый донор  
№ №3 - 10 - больные с различными гематологическими заболеваниями.  
№ 11 - контроль по H<sub>2</sub>O  
№12 - контрольная ДНК ПВ В19

Фиг.2

R U ? 1 4 6 3 7 2 C 1

R U 2 1 4 6 3 7 2 C 1